

ニワトリのW染色体に特異的な反復DNAの構造と属特異性に関する研究

著者	刀襴 正英
号	334
発行年	1984
URL	http://hdl.handle.net/10097/17043

氏 名 (本籍) と ね まさ ひで
刀 瀬 正 英

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 3 3 4 号

学位授与年月日 昭和 6 0 年 3 月 2 6 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程)農芸化学専攻

学 位 論 文 題 目 ニワトリの W 染色体に特異的な反復
DNA の構造と属特異性に関する研
究

論文審査委員 (主 査)

教授 水 野 重 樹 教授 高 橋 甫

助教授 藤 尾 芳 久

論文内容要旨

第 I 章 序 論

高等動物の染色体構成（核型）は、通常雌雄異型である。すなわち哺乳類などの XX/XY 型の性染色体構成を示すものでは、XX 型のものが雌に XY 型のものが雄に分化する。それに対し鳥類、爬虫類などにみられる ZZ/ZW 型のものでは、逆に ZZ 型のものが雄に、ZW 型のものが雌に分化する。Y 染色体や W 染色体は、このように性の分化に重要な役割を果たしているものと考えられるが、体細胞の間期の核内においては、その大部分が高度に凝縮したヘテロクロマチン構造をとっており、遺伝情報発現は、不活性化されているものと考えられる。Y 染色体や W 染色体に含まれる遺伝子機能や体細胞における異常凝縮の分子機構については、ほとんど説明されていないが、これらの染色体に比較的特異性の高い DNA として、ヒトの Y 染色体、ヘビの W 染色体を構成する反復 DNA の存在が報告されている。鳥類の W 染色体についての研究は、ほとんど行われておらず、C-banding 染色の結果より反復 DNA に富む染色体であることが推定されるにとどまっている。

本研究は、鳥類のうちニワトリ（白色レグホン）を材料とし、この W 染色体に含まれる反復 DNA 配列を検索し、その W 染色体特異性、進化的起源および、その他の諸性質を明らかにすることを目的としたものである。また、W 染色体に特異性の高い反復 DNA が存在すればそれをクローン化してプローブとして用いることにより、雌ニワトリのゲノム DNA ライブラリーから W 染色体由来の配列を選択することも可能となり、性染色体 DNA の機能解析を進める上で有用であると考えられた。

第 II 章 ニワトリの W 染色体に特異的な反復 DNA 配列の検索とクローニング

ニワトリの W 染色体に特異的な反復 DNA 配列の検索は、W 染色体が雌のゲノム中にのみ存在することを利用した 2 種類の方法を用いて行った。一つは、全反復 DNA を対象として雌に特異的な DNA 成分を検索する方法である。すなわち ^3H -標識した雌白色レグホンの全反復 DNA と大過剰の水銀化した雄白色レグホンの DNA を反復配列のみが再会合する Cot 10 まで反応させ SH-sepharose カラムクロマトグラフィーにより、雄の水銀化 DNA ならびに雄の DNA とハイブリッド形成した雌の ^3H -DNA を除き、雄の DNA とは、ハイブリッド形成しない雌に特異的な ^3H -DNA 成分を濃縮した。この SH-sepharose カラムに結合しない ^3H -DNA 画分 (^3H -SHU-DNA) をプローブとして、雄と雌の DNA を固定した DNA フィルターに対するハイブリダイゼーション実験の結果、この画分中には、雌の DNA に特異的な雌ゲノム中に特に富む反復 DNA の存在が明らかとなった。第二の方法は、特にクローニングに適した方法で、制限酵素による分解状態を比較する方法である。15 種類の制限酵素を用いて雄、雌白色レグホンのゲノム DNA を分解し、アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド蛍光染色を行い、雄と雌の DNA の分解パターンを比較したところ、制限酵素 XhoI を用いた場合、Fig. 1 に示したように、約 0.6 kb (1 kb = 1000 塩基対) と約 1.1 kb の位置に雌の DNA に特

異的な切断断片を検出することができた。さらにこの2つの断片をプラスミドベクター pACYC 177 の XhoI 部位にそれぞれを組み込み、クローン化し、得られたクローン pAGD 0601 (0.6kb 反復単位を含むクローン) と

pAGD1101 (1.1kb 反復単位を含むクローン) について挿入断片がそれぞれ1個であることを確認した。雄、雌白色レグホンDNAのXhoI分解物に対し、両クローンDNAをプローブとしてサーザンブロットハイブリダイゼーション (Southern blot hybridization) を行ったところ、どちらのクローンを用いても雌のDNAにおいてのみ約0.6kb、1.1kbの位置にハイブリッド形成が認められた。以上のことより、0.6kb、1.1kbのXhoI断片は、いずれも雌のDNAに特異的な成分であり、両断片は、相同

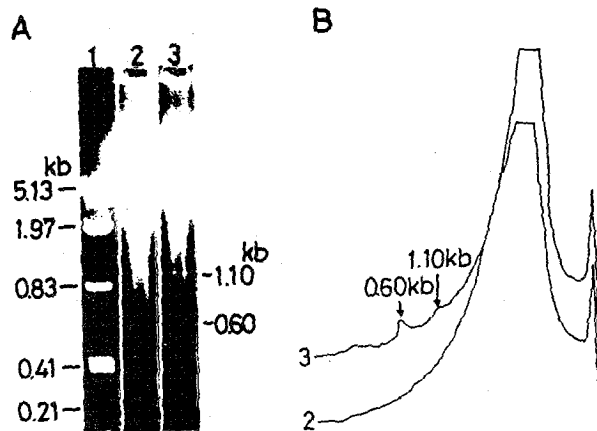


Fig. 1. A Ethidium bromide-stained 1.0% agarose-gel after electrophoresis. Lane 1: PM2 DNA digested with Hind III (molecular size markers), lane 2: chicken DNA from males digested with Xho I, lane 3: chicken DNA from females digested with Xho I. B Densitometric tracing of the lane 2 (male) and the lane 3 (female) in A



Fig. 2. Southern blot hybridization of 2.5 ug DNA each of female human (H) and male (M) and female (F) White Leghorn, digested with Xho I and subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel. The labelled probe was ^{32}P -pAGD0601 (sets 1-3) or ^{32}P -pAGD1101 (sets 4-6). After hybridization, membrane filters were washed at 65°C in 2 x SSC (sets 1 and 4), 0.3 x SSC (sets 2 and 5) or 0.1 x SSC (sets 3 and 6) and autoradiographed

性の高い塩基配列を含むことが明らかとなった。しかしハイブリダイゼーション実験の際の洗浄条件をFig. 2, set 3, 6 に示すような、塩基対相補性の極めて高いハイブリッドのみが安定に保たれるような条件にすると、0.6kb クローンをプローブとした場合には、0.6kb 断片との、1.1kb クローンをプローブとした場合には、1.1kb 断片とのハイブリッド形成が特異的に残ることより、両配列間の相同性は、非常に厳密ではなく、ある程度の塩基配列の差異が存在することが推定された。また ^3H -標識した両クローンDNAをプローブとし雄雌白色レグホンの72時間胚の染色体ならびに間期の核に *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、両配列ともW染色体に特異的な成分であり、間期核内では、ヘテロクロマチンの構成成分として存在することが確認された。

第 Ⅲ 章 ニフトリのW染色体に特異的な反復DNAの反復回数と塩基配列上の特徴

白色レグホンのW染色体に特異的な約0.6 kb および1.1 kb XhoI 断片の同種の二倍体(diploid) ゲノム(2.54 pg) 中での反復回数の測定をTable 1 に示すような種々の方法を用いて行った。その結果、雌ゲノム中で0.6kb 反復単位は、約14000 回、1.1 kb 反復単位は、約6000 回反復していることが明らかとなった。W染色体DNAが二倍体ゲノムを構成する全DNAの約1.4%を占めると仮定して、この反復回数から計算すると、これら反復DNAは、W染色体DNA中の約50%を占める主要成分であることが示された。またクローン化された0.6 kb 反復単位の全塩基配列を決定したところ(Fig 3)約4塩基のA-, T-クラスターを含む約20bp からなる特徴的な繰返し配列が内在すること、高等動物DNA中のシトシン残基のメチル化修飾の対象となる-CG-の配列が多数存在するなどの特徴が明らかとなった。また1.1kb 反復単位の塩基配列を、1.1 kb 断片中のTaqI 部位からランダムに約900bp 決定した結果、0.6 kb 単位同様約20bp の繰返し単位が認められ、0.6 kb 単位と90%以上の塩基配列相同性を示す部分が存在していた。一方白色レグホンのDNAを制限酵素Hae IIIで分解するとその大部分のDNAは、9 kb 以下の断片に分解されるが約2%の部分は、完全分解後も20 kb 以上の断片として検出された。0.6 kb、および1.1 kb の反復単位を含むクローンをプローブとしてサーザンブロットハイブリダイゼーションを行ってみると、これらの配列は、いずれもこの20 kb 以上の断片中に含まれることが示された。この20 kb 以上のHae III抵抗性断片中に0.6 kb 関連配列(1.1 kb 配列も含めて)の占める割合は、20~25%と推定された。Hae IIIは、4塩基認識の制限酵素であるから比較的その認識部位は、高頻度で存在するはずである。すなわち20 kb 以上に

Table 1. Repetition frequencies of the Xho I 0.6-kb and 1.1-kb units and the Xho-I 0.6-kb-related sequences in the diploid genomes of the female and male White Leghorn and the female Fayoumi. Methods of determination were: densitometry of ethidium bromide fluorescence (EtBr), semiquantitative Southern blot hybridization under the condition of probe excess, and dot-blot hybridization. UD means undetectable

Genome	Xho I 0.6-kb unit		Xho I 1.1-kb unit		Xho I 0.6-kb related sequences Dot-blot
	EtBr	Southern blot	EtBr	Southern blot	
Female White Leghorn	12,000-18,000	11,000-14,000	5,500-6,600	4,300-6,300	25,000-34,000
Male White Leghorn	UD	UD	UD	UD	500-1,200
Female Fayoumi	UD	300	UD	400	5,000-5,500

わたり HaeIII の認識部位が存在しないということは、ゲノム中のこのDNA領域がかなり特徴的な反復配列に富むことを示唆しており、このような領域中に 0.6 kb, 1.1 kb 反復単位が含まれることが明らかとなった。

第 IV 章 ニフトリの W 染色体に特異的な反復 DNA におけるメチル化修飾

雌白色レグホンの DNA を制限酵素 Hap II または Msp I で分解したのち、 ^{32}P -標識した 0.6 kb クローンをプローブとしてサザンブロットハイブリダイゼーションを行うと、Fig. 4 に示したように Hap II 分解では、比較的高分子域に残存している DNA 部分とハイブリッド形成が認められ、Msp I 分解では、0.6 kb ~ 2 kb の位置に複数のバンドとしてハイブリッド形成が認められた。Hap II および Msp I は、共に -CCGG- の塩基配列を認識し切断するが Hap II は、中央のシトシン残基がメチル化修飾されていると切断できないのに対し Msp I は、この位置がメチル化されていても切断する。すなわち、0.6 kb、および 1.1 kb の反復単位の内部およびその近傍の Hap II 認識部位がかなり高頻度にメチル化修飾されていることが示された。また 0.6 kb 反復単位内部には、Hap II と Hha I が、1.1 kb 内部には、Hha I 認識部位が存在

```

1      50
CTCGAGAAATACCACCTTTTCTCTCGAAATCATGCCATTTTCATCCAAAAA

51      100
TACCACCTGTCTCCCAAAATTCGCACTTCCTTCCCGAAAAATACCACCT

101      150
TTCCGCTGGGAAATAACACATTCTACCCAAATATAACACGCTTCACCTCAC

151      200
AAAGCAGCGCATTTTCACCCGAAAGTACCACCTTCAGCCGAAATACGCT

201      250
TTTTCCTCCAGAAATACCACCTTCTCAAACAGAAATATCAGCTTTTCGCC

251      300
AAGAAAAATAGCACCAATTCACCCAAAAATACCGCGTTTCTCTCAGATACCT

301      350
TTCTCAGCGAAATCACACATTTTCTCCGAAGTACCACCTTGCACACGAAA

351      400
ATCAGCGATTTTCTCGCGGAAACAAACCATTTACCCGAAATCAGTCTTT

401      450
TCTTCCGGAAGATAGCTTTATCAGCTCTGAAAACTACTCGTTTTCGCCG

451      500
AAAAATCAGCGATTTTCCCTTCGTAAATTCGCCATGTCGCCAGAAAAATAA

501      550
TTCATTTCTTACCGTAAATGCCCTTTTTCACCCAAAAATCAGCGATTTTC

551      600
CCCCCGGAAAAACGCACCTCTGTCCAAAGATCAGCGATTTTCTACCCGAA

601      650
AATACCGATTTTGGCTGGGAAATAACACATTTCTCCGCCAAATATACCAC

651      683
CTTTCACCCCAAAATCAGCGATTTTCTCTCGAG

```

Fig. 3. Nucleotide sequence of the cloned 0.6-kb repeating unit.

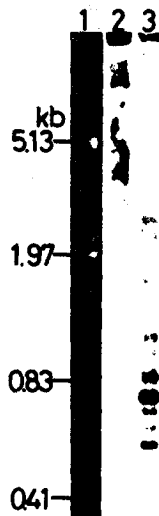


Fig. 4. Southern blot hybridization of Hap II-(lane 2) or Msp I-(lane 3) digested DNA from the female White Leghorn with ^{32}P -pAGD0601. Lane 1: PM2 DNA digested with Hind III (size markers). After hybridization, the membrane filter was washed in 0.3xSSC and autoradiographed

する。HhaI の
認識部位は、
-GCGC-である
が、これもHapII
同様中央のシ
トシン残基がメ
チル化修飾され
ていると切断さ
れない。雌白色
レグホンの全DNA

をXhoI+HapII
または、XhoI+
HhaI で二重分
解したのち、³²P
一標識した0.6
kb クローンを

プローブとしてサーザンブロッ
トハイブリダイゼーションを
行った結果Fig.5に示した
ようにXhoI 分解で生じる
0.6 kb, 1.1 kb の両断片へ
のハイブリッド形成量が二重
分解によっても変化を生じ
ないことから、0.6 kb, 1.1
kb 反復単位中のHapII,
HhaI 部位は、ほとんど完
全にメチル化修飾されてい
ることが示唆された。

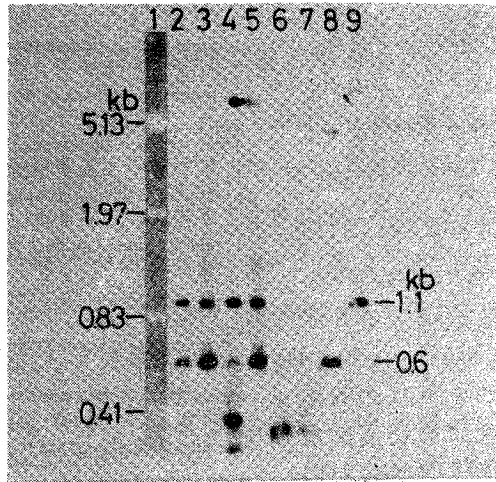


Fig. 5. Search for the site of methylation in the Xho I 0.6-kb and 1.1-kb repeating units in 2.5 ug DNA from female White Leghorn digested with Xho I (lane 2), HapII + Xho I (lane 3), Msp I + Xho I (lane 4) or HhaI + Xho I (lane 5), pAGDO60I (2.5 ug each) digested with Xho I (lane 8) or HhaI + Xho I (lane 6), pAGD110I (2.5 ug each) digested with Xho I (lane 9) or HhaI + Xho I (lane 7) were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel and Southern blot hybridization with ³²P-labelled Xho I 0.6-kb unit. After hybridization, the membrane filter was washed in 0.3 x SSC and autoradiographed. Lane 1: PM2 DNA digested with Hind III (size markers)

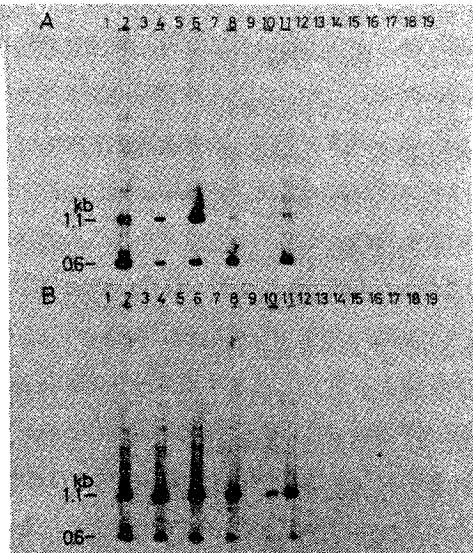


Fig. 6. A,B. Southern blot hybridization of Xho I-digested genomic DNA with ³²P-pAGDO60I (A) or ³²P-pAGD110I (B). DNA samples (2.5 ug each) were from White Leghorn (lanes 1 and 2), Japanese Game (lanes 3 and 4), Nagoya Cochon (lanes 5 and 6), Barred Plymouth Rock (lanes 7 and 8), Fayoumi (lanes 9 and 10), MSB-1 cells (lane 11), Japanese common pheasant (lanes 12 and 13), guinea fowl (lanes 14 and 15), Japanese quail (lanes 16 and 17), and rock dove (lanes 18 and 19). DNA samples in lanes 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 18 were from the males of the species and in lanes 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17, 19 were from the females. After hybridization and standard washing, membrane filters were washed in 0.3 x SSC and autoradiographed

第V章 ニワトリのW染色体に特異的な反復DNAのGallus属特異性について

W染色体を構成する反復DNAとしては、ヘビのW染色体に含まれるBkm配列の存在が明らかとなっている。そこで本研究で見出されたニワトリのW染色体由来の反復DNA配列と、このBkm配列との関係を調べてみた。Bkm配列とハイブリッド形成するショウジョウバエ由来のクローン316-8Aを³²P-標識プローブとして雄、雌白色レグホンの全DNAのXhoI分解物に対するサザンブロットハイブリダイゼーションを行った結果0.6 kb, 1.1 kbの位置にハイブリッド形成が全く認められず、白色レグホンのW染色体を構成する主要反復DNA配列は、Bkm配列とは、異なっていることが明らかとなった。

本研究で白色レグホンからクローン化された0.6 kb, 1.1 kbの反復単位他種における存在を検討するため、5種の家鶏品種（白色レグホン、シャモ、名古屋コーチン、横斑プリマスロック、ファウミ）およびニワトリと同じキジ目のキジ、ウズラ、ホロホロチョウ、ハト目のカワラバトのDNAをXhoIで分解後³²P-pAGD0601, -pAGD1101をプローブとしてサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。その結果は、Fig.6に示されているように5種類の家鶏品種では、すべて約0.6 kbと1.1 kbの位置にハイブリッド形成が認められたのに対し、その他のキジ目、ハト目の種では、ハイブリッド形成は、認められなかった。また家鶏の祖先種に最も近いと考えられている野鶏のうち調べた3種の野鶏（赤色野鶏、灰色野鶏、緑エリ野鶏）のDNAの場合両反復成分が白色レグホンと同様に検出されたことから、この反復DNA成分の起源は、キジと現在の野鶏の祖先種が分化した後野鶏の祖先種のゲノム中で増幅したものと推定された。ところで調べた5種の家鶏品種の中でエジプト産のファウミについては、0.6 kb, 1.1 kbの反復単位の存在量が著しく減少しており、その二倍体ゲノム中での反復回数は、白色レグホンの $\frac{1}{6}$ 程度であることが明らかとなった（Table 1）。しかしファウミのW染色体の大きさは、この減少量に見合った変化は示しておらず、0.6 kb, 1.1 kb反復DNAファミリーの大部分がファウミでは、塩基配列の相当に異なる他のDNA成分に置き変わっていることが示唆された。以上の結果より、ニワトリのW染色体を構成する主要反復DNAである0.6 kb, 1.1 kb反復ファミリーは、Gallus属（野鶏+家鶏）に特異的なDNA配列であること、反復回数にかなり大きな変動を示す場合があることが明らかとなった。また0.6 kb, 1.1 kb成分を保持している各種においてこの成分のHapII, MspI分解のパターンは、白色レグホンの場合とはほぼ同様であったことから、メチル化修飾の状態も同様に保持されていることが明らかとなった。

一方、雌白色レグホンDNAをHaeIIIで分解して得られる20 kb以上の断片（20～25%が0.6 kb, 1.1 kb反復ファミリーに相当）を³²P-標識プローブとし、キジ、ウズラ、ホロホロチョウ、カワラバト、メジロ、セキセイインコの雄と雌のDNAに対し、ドットブロットハイブリダイゼーションを行った結果、雌白色レグホンDNAのHaeIII抵抗性画分の0.6 kb, 1.1 kb反復ファミリー以外の75

～80%成分中には、キジ目、ハト目の種と共通する配列で、W染色体DNA中に存在割合の大きい配列が一部含まれることを示唆する結果も得られた。

第VI章 総 合 考 察

鳥類のW染色体は、一般にC-banding染色の結果より反復DNAに富みその大部分は、間期の核内においても高度に凝縮したヘテロクロマチン構造をとっているものと考えられている。本研究では、ニワトリのW染色体に特異的な反復DNA成分が存在することを2種の異なった方法を用いて確認したのち、制限酵素XhoIにより切り出されて来る雌に特異的な約0.6 kbおよび1.1 kbの断片のクローニングを行った。得られたクローンは、W染色体DNA中の約50%を占める主要な反復DNAファミリーの反復単位であり、間期の核に対するin situハイブリダイゼーションの結果、一ヶ所へのgrainの集中が認められたことより、この反復DNA成分がヘテロクロマチンの構成成分であることが明らかになるとともに、C-banding染色の結果を強く支持する結果となった。また一般に反復配列は、複数の染色体上に分布する場合が多いのに対し、この0.6 kb, 1.1 kb反復DNAファミリーは、W染色体上に局在しているという特徴を有している。

0.6 kbおよび1.1 kb反復単位は、XhoI分解により比較的均一なバンドとして検出された。しかしこれらの単位中には、不完全ながらさらに小さな、約20 bpの繰返し単位が存在していることが明らかになった。おそらくこの反復DNA成分は、初め約20 bpの塩基配列としてゲノム中で増幅し、それらに進化の過程である程度の塩基配列変化を生じて、現在の0.6 kbと1.1 kbの両端にXhoIの認識部位をもつ形でもう一度ゲノム中で増幅したものと考えられる。これらの配列中には、高等動物DNAにおいて主にメチル化修飾の対象となる-CG-の配列がこれまでに決定されたニワトリの他のDNA配列に比較して高い頻度で存在していた。実際この反復DNA成分の近傍および内部のHapII, HhaI 認識部位が高頻度にメチル化修飾を受けていることが認められた。これらの-CG-配列のメチル化修飾がW染色体のクロマチン構造の凝縮性と関係する可能性もありW染色体の機能調節上重要な役割を果たしているため、進化の過程で保存されて来た可能性も考えられる。

W染色体に特異的なこの0.6 kb, 1.1 kbの反復単位は、Gallus属（野鶏+家鶏）に特異的で、ニワトリと同じキジ目に属するキジ、ホロホロチョウ、ウズラでは、検出されなかった。この結果は、これらの配列が野鶏の祖先種がキジ目の他種から分岐した時点で増幅されたものであることを示唆している。現在の家鶏は、赤色野鶏から家禽化されたとする一元説が有力であるが本研究における0.6 kb, 1.1 kb配列との相同性との分析結果からは、赤色野鶏、灰色野鶏を区別することは、困難であった。ただ緑エリ野鶏の場合は、MspI, Hinf Iによって異なった分解パターンが得られることから、現在の家鶏品種との関係は、赤色、灰色の両野鶏種よりも隔たっていることが示唆された。この結果は、橋口らによる血液タンパク質の電気泳動分析に基づく結果と一致している。

0.6 kb, 1.1 kb 反復DNAファミリーが検出されなかったトリにおいてもW染色体は、ニワトリと同様にはほぼ全域がヘテロクロマチン構造をとっている。0.6 kb, 1.1 kb 反復DNAは、ニワトリのW染色体のヘテロクロマチン部分の主要成分であることから、ヘテロクロマチン化に必要な塩基配列上の特徴を含んでいる可能性が高い。ショウジョウバエのヘテロクロマチン部分には、AT に富む塩基配列からなるサテライトDNAが含まれるが、この配列を認識して結合する非ヒストン性のクロマチンタンパク質の存在が報告されている。鳥類のW染色体においてもこのような特定のDNA配列を認識するクロマチンタンパク質の存在は、十分に考えられるが、もしその様なタンパク質が存在したとしてもそれは、おそらく塩基配列全体を認識するものでなく、0.6 kb, 1.1 kb 反復単位中に認められるようなA-, T-クラスターやメチル化修飾塩基の存在や、配列の反復状態のような特徴を認識するものではないかと考えられる。

本研究で見出された反復DNA配列がGallus属のW染色体に特異的であることは、これらのクローンがW染色体のクロマチンを核内から分画する際に、またW染色体由来の遺伝子クローンをゲノムDNAライブラリーから検索する際に有力なプローブとして利用できることを示している。また、これらのクローンは、雄ニワトリ胚に移植された雌ニワトリ胚の細胞の移動や器官形成の過程を追跡する有効なプローブとして既に他の研究グループによって利用されている。

審 査 結 果 の 要 旨

ZZ/ZW 型の性染色体構成を有する鳥類のW染色体は雌に特有の性染色体であり、性決定を中心とする限定的機能を有する染色体であると考えられるが、その遺伝子の諸性質は明らかにされていない。また、W染色体は体細胞核内では異常凝縮してW-ヘテロクロマチンボディーを形成しているが、そのクロマチン凝縮の機構も不明である。

本研究は高度反復DNA配列がヘテロクロマチン域に局在するといういくつかの知見に基づき、ニワトリのW染色体に特異的な反復DNA配列を検索すること、そのような配列が存在すればクローン化して、その諸性質を明らかにすることを目的としたものである。著者は先ず、雌白色レグホンの反復DNAを分画、³H-標識して、これを大過剰の、部分的に水銀化した雄のDNAとハイブリッド形成させ、SH-セファロースクロマトグラフィーによって水銀化DNAとハイブリッド形成しない³H-DNAを分画した。そしてこの画分に雌特異的な反復配列が濃縮されることを示した。次に、雌、雄のDNAを種々の制限酵素で分解してその分解パターンを電気泳動的に比較し、Xho I分解によって雌特異的な約0.6 kb (1 kb = 1000 塩基対) 1.1 kbの断片が得られることを見出した。さらに、これらの断片をプラスミドベクター pACYC 177 に挿入してクローン化し、両配列の諸性質について研究を行った。その結果、白色レグホンのW染色体中で0.6 kb配列は約14,000回、1.1 kb配列は約6,000回反復して存在し、両反復ファミリーはW染色体DNAの約50%を占めること、両反復単位の塩基配列は約90%近い相同性を示し、いずれも約20塩基対の内部繰り返し単位から構成されていること、この内部繰り返し単位中には逆方向の繰り返し配列が存在し、ステム・ループ構造を形成し得ること、これらの反復配列は野鶏および家鶏のGallus属に特異的で進化上新しく増幅した配列と考えられることなどの諸点が明らかとなった。

以上、本論文はGallus属のW染色体に極めて特異性の高い反復配列を発見し、その諸性質を明らかにし、性染色体のDNAならびにクロマチン構造の研究に有力な手がかりを与えたもので、審査員一同、著者は農学博士の学位を授与されるに十分な資格を有すると判定した。